

## 主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 第 号	氏 名	山田 翔士
主 論 文 題 名 : 高脂肪食誘導 NASH-HCC マウスモデルにおける病態と腸内細菌叢・代謝物との関係性の検討 ～ mTOR signaling と酸化ストレスの関与 ～			
(内容の要旨) [目的]  これまでの研究においては、マウスに高脂肪食を給餌することに加え、化学 (発癌) 物質を投与することが非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) から肝癌 (HCC) を誘導するマウスモデルとして一般的に用いられてきた。2 次胆汁酸は腸内細菌によって 1 次胆汁酸から代謝される。Deoxycholic acid (DCA) のような 2 次胆汁酸は HCC において細胞老化因子 (SASP) の産出を促進する。本研究では、マウスに新しいタイプの high-fat diet (HFD) を発癌物質 (Carcinogen) なしで負荷した。HFD の負荷に加え、抗生物質を投与した群も作成し、NASH-HCC の病態と腸内細菌叢・代謝物の関係性を検討した。マウスを用いた <i>in vivo</i> の実験においては腸内細菌叢、炎症、腸内細菌の代謝物、肝臓や糞便における胆汁酸などの代謝物組成、タンパク質レベルの発癌シグナル、肝臓・血中の酸化 / 抗酸化指標の解析を行い、 <i>in vitro</i> では hepatoma cell line の HepG2 を用いて <i>in vivo</i> で挙げた発癌経路活性化リガンド候補物の同定を行った。  [方法]  野生型 C57BL/6J マウスを、コントロール食群 (CONT)、高脂肪食群 (STHD-01)、STHD-01 給餌に抗生物質を投与した群 (STHD-01+Abx) の 3 群に分けた。マウスはコントロール食または高脂肪食を 9 週または 41 週給餌し、抗生物質投与群に関しては餌を投与する 1 週間前から抗生物質を投与した。筆者たちは網羅的に腸内細菌叢の変化、胆汁酸の肝臓・糞便中組成、胆汁酸トランスポーターに関連する遺伝子発現、炎症性因子、そして発癌因子と酸化 / 抗酸化因子を解析			

した。

#### [結果]

STHD-01 群においては肝傷害や炎症性の因子の増加に伴って肝癌が発癌した。STHD-01 群の肝臓の組織学的検索では、異型性や monotonous cell への置換など HCC の特徴が認められた。STHD-01+Abx 群ではこれらの特徴が改善した。腸内細菌の総菌数は CONT と STHD-01 群で違いは認められなかった、一方、腸内細菌の種類の豊富さは異なっていた。*Bacteroides* や *Clostridium* cluster XIII は増加し、*Streptococcus*、*Bifidobacterium* や *Prevotella* は減少していた。STHD-01+Abx 群においては、腸内細菌の総菌数が 100 分の 1 に減少し、*Enterococcus* がほとんどを占めていた。糞便や肝臓中における総胆汁酸量は STHD-01 を給餌した 2 群で 9 週または 41 週において上昇していた。胆汁酸合成に関与する酵素に関しては 3 群間で大きな変化はなく、再吸収に関与するトランスポーターは短期実験で、STHD-01 群で減少し、STHD-01+Abx 群で回復していたものが、長期実験では STHD-01+Abx 群でも STHD-01 群と同様に減少傾向や有意に減少を示した。糞便において、STHD-01 群では高い割合の 2 次胆汁酸が検出された。肝臓において DCA と tauro-DCA という farnesoid X receptor (FXR) のアゴニストである有害な 2 次胆汁酸は STHD-01 群で検出され、STHD-01+Abx 群では検出されなかった。STHD-01+Abx 群では 1 次胆汁酸で NAFLD 抑制作用がある tauro- $\beta$  muricholic acid (T $\beta$ MCA) が検出された。mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナリングにおける FXR アゴニストの振る舞いを解析するために、筆者たちは mTOR・extracellular signal regulated kinase (Erk)・signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) という肝癌に関与する発癌シグナルを確認した。mTOR だけが、STHD-01 群で有意に上昇し、STHD-01+Abx 群で有意に減少した。そこで HepG2 細胞に FXR のアゴニストである cholic acid (CA)、cheno deoxy

cholic acid (CDCA) と DCA を投与した。すると DCA でのみ mTOR の活性化が上がっていた。検討の結果 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 依存的に作用した。STHD-01+Abx 群では *Enterococcus* が菌叢のほとんどを占めていること、かつ肝臓で 2 次胆汁酸の urso deoxy cholic acid (UDCA) や tauro-UDCA (TUDCA) が検出されたことより、*in vitro* で腸内細菌による 1 次胆汁酸代謝能を確認したところ、*Enterococcus faecalis* を含む 2 種類が CDCA を UDCA に代謝する代謝能が確認できた。また肝臓において酸化・抗酸化関連タンパク質である NF-E2 related factor 2 (Nrf2) が STHD-01+Abx 群で上昇していたことより、解析したところ、肝臓中の抗酸化物質や血漿中の抗酸化力が STHD-01+Abx 群で他の 2 群に比して有意に上昇していた。

#### [考察]

1. STHD-01 群にて生じた NASH-HCC は、組織学的検索、および肝臓・血中のマーカーの結果から STHD-01+Abx 群では改善が認められた。
2. STHD-01 群では短期実験に引き続き monocyte-macrophage 系細胞の賦活化が示唆された。STHD-01+Abx 群にて賦活化は低下し、その結果肝傷害が抑制されたと考えられた。
3. 腸内細菌叢に関して長期実験の CONT 群と STHD-01 群の菌叢比較、短期実験と長期実験間での各群の菌叢比較で異なる菌叢が認められ、STHD-01+Abx 群では菌数が 100 分の 1 に減少し、菌叢も *Enterococcus* がそのほとんどを占めていた。
4. 肝臓中のコレステロール量は STHD-01 給餌両群において増加していた。胆汁酸合成酵素の発現を調べた結果、STHD-01+Abx 群による大きな変化は認められなかった。
5. 小腸回腸部における胆汁酸再吸収トランスポーター等の遺伝子発現を調べた結果、短期実験では STHD-01 群では腸管内腔側→粘膜内→門脈血側に至る胆汁酸輸送遺伝子の発現が低下し、胆汁酸の再吸収が抑制されていたが、STHD-01+Abx 群では回復傾向であった。長期実験では

STHD-01+Abx 群は STHD-01 群と同様に低下傾向であった。これは肝臓中の総胆汁酸量の結果と一致した。

6. メタボロミクスの結果より、STHD-01 群では 2 次胆汁酸が胆汁酸の組成内に占める割合や種類が増加していることが示唆された。また STHD-01+Abx 群では腸内細菌の減少により 2 次胆汁酸への代謝が減少することが示唆された。その結果 NAFLD 進展抑制作用がある T $\beta$ MCA が優勢であった。この結果は HPLC による網羅的な胆汁酸分析によって検証された。

7. 肝臓中の短期実験・長期実験の胆汁酸組成では、STHD-01 群で細胞老化作用がある DCA とその抱合体が検出されたが、STHD-01+Abx 群では検出されなかった。

8. 発癌関連タンパク質である mTOR の活性化は *in vivo*、*in vitro* の結果より DCA の生理的濃度で活性化されることが示唆された。

9. STHD-01+Abx 群でほとんどを占めている *Enterococcus* のうち *Enterococcus faecalis* を含む 2 種類が CDCA を抗腫瘍効果がある UDCA に代謝する代謝能が確認でき、これが STHD-01+Abx 群の病態抑制に寄与している可能性が考えられた。

10. STHD-01+Abx 群では肝臓・全身の抗酸化力が上昇していることがタンパク質発現、メタボローム解析の結果より示唆された。

#### [結論]

新しいタイプの高脂肪食では化学発癌物質の投与なく肝癌が発生し、抗生物質の投与によって抑制されていた。筆者の解析では、食餌や腸内細菌の変化による胆汁酸の代謝やそれに伴う肝臓への胆汁酸の再吸収が変化していた。腸内細菌によって代謝された 2 次胆汁酸 DCA による PI3K を介した mTOR シグナリングの活性化や T $\beta$ MCA・UDCA による NAFLD 抑制・抗腫瘍作用など、肝癌病態に胆汁酸が大きな役割を果たしていることが明らかになった。